

【特許請求の範囲】

【請求項1】 凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させることを特徴とする走査電子顕微鏡用生物試料作製方法。

【請求項2】 凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させ、温度上昇過程における試料の状態を走査電子顕微鏡により観察することを特徴とする生物試料観察方法。

【請求項3】 試料が配置される試料室と、該試料室を排気する手段と、前記試料を凍結する手段と、前記試料を加熱する手段と、該加熱手段の温度を零度より高い温度まで昇温させる手段とを備えた走査電子顕微鏡用生物試料作製装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、走査電子顕微鏡で水分を含んだ生物試料を観察するための走査電子顕微鏡用生物試料作製方法および生物試料観察方法並びに走査電子顕微鏡用生物試料作製装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 水分を含んだ生物試料を走査電子顕微鏡で観察する際、その試料はできるだけ生体時に近い状態に維持する必要がある。しかし、生物試料はその70～80％が水分であり、試料を抽出後そのまま走査電子顕微鏡内に挿入すれば装置内が真空のため、水分が気化し乾燥による収縮変形を起こすことが多い。

【0003】そこで、現在、生物試料を走査電子顕微鏡で観察する前に、生物試料に処理が行なわれる。図1(a)は、従来の生物試料作製の手順を説明するために示したものであり、従来の生物試料作製の手順は以下の通りである。

【0004】①試料の抽出が行なわれる。試料の抽出は、試料が乾燥しないように手早く細分化する必要がある。

【0005】②抽出した試料が洗浄される。洗浄する理由は、抽出した試料はそのままでは試料表面に粘液や細胞内顆粒が付着しており、走査電子顕微鏡で観察する際、試料の観察すべき部位が覆い隠される恐れがあるためである。通常は抽出した試料の端をピンセットでつまみ、そのまま緩衝液中で振り洗いをする（これを2～3回繰り返す）。この洗浄にかかる時間は30分程度である。

【0006】③洗浄された試料は固定処理が行なわれる。固定とは、試料に化学的变化を与えて硬化させることである。生物試料を固定する場合、通常は1～2.5％グルタルアルデヒド固定液、1％オスミウム固定液などが使用されるが、固定法としては固定液を一種類だけで固定する「単独固定」と二種類の固定液を使って順次固定する「二重固定」とがある。グルタルアルデヒ

ド固定液は主にタンパク質のみの固定であるが、オスミウム酸固定液はタンパク質、脂質分が固定されるため比較的固く固定される。「単独固定」では、生物試料はグルタルアルデヒド固定液中で1～2時間以上、オスミウム固定液中で1～2時間以内固定される。また、「二重固定」では、生物試料はグルタルアルデヒド固定液中で1～2時間以上固定される。

【0007】④生物試料は、試料と化学反応しなかった固定液を除去するために、緩衝液で洗浄される。余分な固定液が残っていると試料を乾燥した際に、試料表面にオスミウム酸などの結晶が析出し観察の妨げになる。この洗浄にかかる時間は30分～2時間程度である。

【0008】⑤生物試料中の水分をエチルアルコール、アセトンなどの有機溶媒と置換し除去する脱水処理が行なわれる。これは有機溶媒が水に比較して表面張力が1/3程度小さいことにより収縮変形による影響が小さく、乾燥時間が短いことによる。しかし、100％の有機溶媒中に水分を含んだ試料を直接入れると脱水作用が急激に進み、試料が収縮変形する。始めはアルコール（アセトン）などを精製水（純粋・蒸留水）で希釈し、50％溶液とした中に水分を含む試料を浸し、脱水する。同様に60％、80％、90％、95％、99％溶液を作り、順次高濃度の溶液の中に試料を移し変えていく。試料を1つの溶液に浸す時間は5～15分程度である。最後に、生物試料を100％のエチルアルコールの中に浸し脱水するが、試料を浸す時間は30分程度で、2回脱水処理が行なわれる。なお、変形を起こしやすい試料は2％溶液から脱水処理が行なわれる。

【0009】以上、試料の脱水処理までが終了したが、これ以降の手順は、臨界点乾燥法とチューブチルアルコール凍結乾燥法により異なる。臨界点乾燥法の手順を⑦で説明し、チューブチルアルコール凍結乾燥法の手順を⑧で説明する。

【0010】⑧脱水処理された生物試料は酢酸イソミル（酢酸アミル）中に入れられ、約15分間放置される。

【0011】⑨⑧の置換処理が行なわれた試料は、耐圧容器内に入れられ、室温の状態で液体二酸化炭素が容器に満たされ、密閉した容器が臨界温度以上に加熱されて容器の圧力は上昇し、容器の圧力がある圧力に達すると二酸化炭素は瞬間的に液体から気体に変移する。そして、そのまま気体を容器外に徐々に排出させると試料は乾燥する。

【0012】⑩⑨の脱水処理が行なわれた試料は、チューブチルアルコールの中に入れられる。⑩チューブチルアルコールに置換された試料は、凍結乾燥装置の試料ステージ上に置かれ、ステージが5℃まで冷やされる（または冷蔵庫内に数十分放置してもよい）。チューブチルアルコールが凍結したら凍結乾燥装置内はゆっくりと排気され、凍結したチューブチルアルコールは昇昇する。昇昇が

終わる圧力が急激に下がり始めたらステージ温度が室温にどされ、大気圧にすると乾燥した試料が出来る上がある。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】 以上、従来の生物試料作製の手順を説明したが、図2はトーチアルコール凍結乾燥法により処理されたアナバナの走査電子顕微鏡による2次電子像を示す図面代用写真である。図2

(a)は、固定液が2%グルテールアルデヒドで、脱水が20%アルコールから行なわれたアナバナの2次電子像であり、アナバナは収縮している。図2(b)は同じ条件で処理されたアナバナの2次電子像であり、アナバナは変形している。このように、アナバナをトーチアルコール凍結乾燥法により処理すると、アナバナは収縮又は変形して原形(生体)を維持しなくなる。又、収縮又は変形というようにこの方法においては再現性がない。図2(c)は、固定液が2%グルテールアルデヒドで、脱水が10%アルコールから行なわれたアナバナの2次電子像であるが、アナバナは収縮している。なお、臨界点乾燥法により処理された試料の2次電子像は挙げなかったが、臨界点乾燥法においてもトーチアルコール凍結乾燥法と同じ問題が生ずる。

【0014】また、従来においては、臨界点乾燥法やトーチアルコール凍結乾燥法による試料作製の過程で試料が変形した場合、走査電子顕微鏡を観察するまで試料の変形が確認できない。このため、せっかく試料を作製しても、その作業が無駄になる場合がある。

【0015】また、臨界点乾燥法やトーチアルコール凍結乾燥法による試料作製においては、化学固定を含む前処理作業と専門知識と習熟度が要求され、また、前述したように多くの処理時間が必要になる。

【0016】本発明はこのような問題を解決する走査電子顕微鏡用生物試料作製方法及び生物試料観察方法並びに走査電子顕微鏡用生物試料作製装置を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】 この目的を達成する本発明の走査電子顕微鏡用生物試料作製方法は、凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させることを特徴とする。

また、本発明の生物試料観察方法は、凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させ、温度上昇過程における試料の状態を走査電子顕微鏡により観察することを特徴とする。また、本発明の走査電子顕微鏡用生物試料作製装置は、試料が配置される試料室と、該試料室を排気する手段と、前記試料を凍結する手段と、前記試料を加熱する手段と、該加熱手段の温度を零度より高い温度まで昇温させる手段とを備えている。

【0018】

【実施例】 以下、本発明の実施例を図面を用いて説明する。図3は本発明の実施例として示した走査電子顕微鏡の概略図である。図3において、1は走査電子顕微鏡の鏡筒、2は試料室、3は試料室2を排気する排気装置である。4は試料ステージで、試料ステージ4はX、Y、およびZ方向に移動可能である。5は吸熱器である。6はサーモモジュールで、サーモモジュール6は、P型半導体7とN型半導体8を金属電極9で接合したホモ型直列回路からなるペルチエ素子を複数または複数並列してセラミック板10で挟んで構成したものである。サーモモジュール6は、電流を矢印Aの方向に流すとペルチエ効果によりその接合部で吸熱が生じ、その反対側で発熱が生じ、また、電流を矢印Bの方向に逆転して流すと、吸熱と発熱が逆転する。したがって、電流の向きを変えることにより、電子的に加熱と冷却が可能である。

11は試料ホルダ、12は生物試料である。図4は試料ホルダ11上に置かれた生物試料12を示したものである。生物試料12は水18で覆われている。なお、水のかわりにアルコール溶液であってもよい。13は試料ホルダ11の温度を検出する温度検出器、14は制御装置である。15はメモリーであり、そのメモリー15には、図11のTに示すような、試料ホルダ加熱開始から所定時間経過後における試料ホルダの目標温度が記憶されている。16は電源、17は真空ゲージである。

【0019】以下、この装置の動作を説明する。

【0020】制御装置14は電源16に冷却信号、すなわち、サーモモジュール6に電流を前記矢印Aの向きに流すための信号を送る。この結果、サーモモジュール6上に位置する試料ホルダ11は冷やされ、試料12も冷やされる。試料ホルダ11の温度は温度検出器13で検出され、その検出信号は制御装置14に送られる。

制御装置14は試料ホルダ11の温度が-4.5℃になると、電源16への冷却信号の供給を停止する。制御装置14が-4.5℃の時点で冷却信号の供給を停止させる制御は、前記メモリー15に記憶されたデータに基づいたものである。この冷却により、試料12は水18に覆われた状態で凍結する。試料の冷却が終わると、制御装置14は排気装置3に排気信号を送り、排気装置3は試料室2を排気する。試料室2の真空度は真空ゲージ17により測定され、その信号は制御装置14に送られており、制御装置14は試料室2の真空度を0.01 Torr ~ 2 Torr の間の低真空状態に設定する。

【0021】次に、制御装置14は電源16に加熱信号、すなわち、電流を前記矢印Bの向きに流すための信号を送る。この結果、サーモモジュール6上に位置する試料ホルダ11は加熱され、試料12も加熱される。試料ホルダ11の温度は温度検出器13で検出され、その検出信号は制御装置14に送られている。制御装置14は、メモリー15に記憶されている温度と、温度検出器13から送られてくる温度を比較し、試料の温度と略同

一とみなし得る試料ホルダの温度がメモリー15に記憶されたデータに基づいて予め設定された速度で徐々に上昇するように電源16を制御する。このようにして、試料は室温である例えば15℃になった時点で温度変化を終了する。

【0022】ここで、加熱による試料12の状態の変化及び生物試料が変形等を起こさない理由を説明する。

【0023】アーチ状または平板状に凍結した水は、試料室内の真空と試料ホルダの温度値の間で昇華を始める。そのスピードは、ホルダの昇温カーブによる。昇華のスピードは、生物試料の細胞膜の構造により若干変更することが必要である。その理由は、細胞内の水の昇華スピードに合わせるためである。そのバランスがくずれると、生物試料に収縮変形を誘発する。つまり、試料を覆った水が昇華完了する前に試料内部の水も全て昇華させることが重要である。

【0024】ところで、試料内部の水が昇華するにしたがって、入射電子線が試料の深部まで拡散し、内部で発生した反射電子が検出可能なため、光学顕微鏡のように内部組織の観察も可能である。なお、従来は化学固定を行っていたため、化学反応により細胞の質量が大きくなって入射電子の拡散が行なわれにくくなり、内部観察が思うようにできなかった。また、試料加熱中の試料像は表示装置（図示せず）に表示され、オペレーターはこの像を観察することにより、温度上昇過程における試料の変形の有無を確認することができる。

【0025】上述した温度処理が行なわれた試料の走査電子顕微鏡の低真空状態における反射電子像及び高真空状態における二次電子像の例をあげる。尚、前記温度処理が行なわれた試料を高真空状態で観察する場合には、チャージアップによる像の劣化を防ぐため、試料にはコーティングが施される。

【0026】図5は、オオミドロの低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真であり、オオミドロの収縮はなく、オオミドロは原形（生体）を維持している。また、本発明の試料作製においては、従来のように試料を化学固定しないので、オオミドロの内部がはっきりと観察できる。図6（a）は、水中に発生した藻の低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真であり、図6（b）は、その藻の高真空状態における二次電子像を示す図面代用写真である。この像から明らかなように、藻の収縮はなく、藻はほとんど原形（生体）を維持している。図7（a）、（b）は、藻の低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真であり、図7（c）は、藻の高真空状態における二次電子像を示す図面代用写真である。図7は図6に示した写真の倍率より高い倍率の写真であるが、藻が原形（生体）を維持していることが一層理解できる。図8（a）は、藻の低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真であり、図8（b）は、藻の高真空状態における二次電子像を示す図

面代用写真である。図9（a）、（b）は、ミジンコの低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真であり、図10（a）、（b）は、ミジンコの高真空状態における二次電子像を示す図面代用写真である。この像から明らかなように、ミジンコの変形もなく、ミジンコは原形（生体）をほとんど維持している。

【0027】図1（b）は、上述した本発明の生物試料作製の操作手順をまとめたものである。本発明の生物試料作製にかかる時間は、数時間程度であり、従来に比べ生物試料の作製時間は大幅に短縮される。

【0028】なお、上記実施例においては、メモリー15を設け、試料の温度上昇をメモリーに記憶された情報に基づいて制御したが、メモリーや制御手段を設けずに実施することもできる。その場合、試料の温度上昇を制御した場合と略同じような速度で試料の温度が上昇するように、周囲から試料ホルダへの熱の流入速度や試料ホルダの熱容量を適切に選択することが必要である。また、試料の温度制御は、試料の温度が前記図12の斜線の範囲内において上昇するように制御してもよい。また、以上の説明においては、試料の作製を走査電子顕微鏡内において行なったが、前記構成を備えた装置、すなわち、試料を冷却および加熱する手段、試料室を排気する手段などを備えた装置内で試料を作製してもよい。

【0029】

【発明の効果】 本発明は、凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させるので、変形のない原形を維持した生物試料の走査電子顕微鏡像を得ることができ、従来のように化学固定を行なわないので試料の内部組織の観察が可能である。また、本発明においては、従来の固定、脱水、置換、臨界点乾燥及び凍結乾燥を行なわなくてすむので、薬品による危険がなくなる。また、本発明の試料作製は非常に簡単なので、試料の出来かたが専門知識と習熟度には左右されず、試料作製時間は従来に比べ著しく軽減される。また、本発明は、凍結した試料を真空引きされた試料室の中に配置し、該凍結試料を零度より高い温度まで昇温させ、温度上昇過程における試料の状態を走査電子顕微鏡により観察するので、試料作製の過程で試料が微妙に変形した場合、試料が変形したかどうかを知ることができ、走査電子顕微鏡で得られた生物試料の像が、原形（生体）を維持した生物試料の像かどうかを判断することができる。また、本発明においては化学固定を行なわないが、出来上がった試料は保存が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来生物試料作製の手順及び本発明の生物試料作製の手順を示したものである。

【図2】エーテルアルコール凍結乾燥法により処理されたアナバネの低真空走査電子顕微鏡による反射電子像を示す図面代用写真である。

【図3】本発明の実施例として示した走査電子顕微鏡の概略図である。

【図4】試料ホルダ上に置かれた生物試料を示したものである。

【図5】本発明の処理がされたアオミドロの低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真である。

【図6】本発明の処理がされた藻の走査電子顕微鏡像を示す図面代用写真である。

【図7】本発明の処理がされた藻の走査電子顕微鏡像を示す図面代用写真である。

【図8】本発明の処理がされた藻の走査電子顕微鏡像を示す図面代用写真である。

【図9】本発明の処理がされたミジンコの低真空状態における反射電子像を示す図面代用写真である。

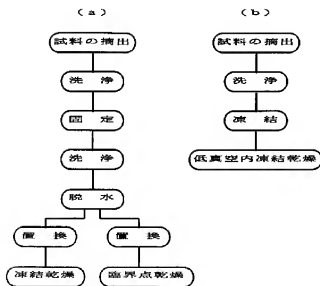
【図10】本発明の処理がされたミジンコの高真空状態における2次電子像を示す図面代用写真である。

【図11】試料ホルダ加熱開始から所定時間経過後における試料ホルダ加熱温度を説明するために示したものである。

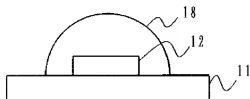
【符号の説明】

- 1 鏡筒
- 2 試料室
- 3 排気装置
- 4 試料ステージ
- 5 暖熱器
- 6 サーモジュール
- 7 P型半導体
- 8 N型半導体
- 9 金属電極
- 10 セラミック板
- 11 試料ホルダ
- 12 試料
- 13 温度検出器
- 14 制御装置
- 15 メモリー
- 16 電源
- 17 真空ゲージ
- 18 水

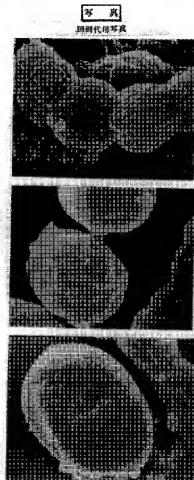
【図1】



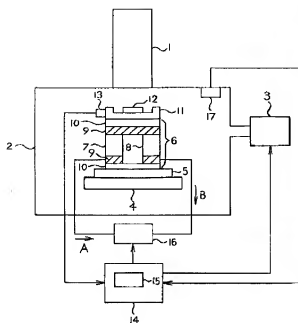
【図4】



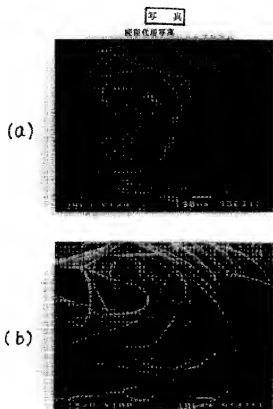
【図2】



【図3】



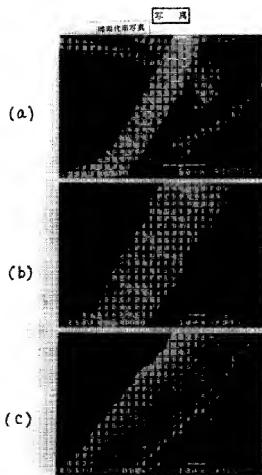
【図6】



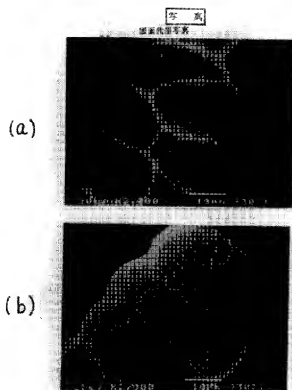
【図5】



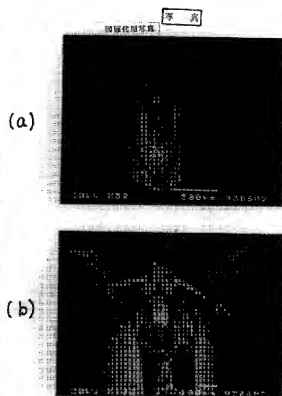
【図7】



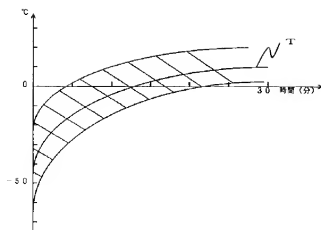
【図8】



【図9】



【図11】



【図10】

